

Apparatus for highly sensitive detection of photosynthesis herbicides in water, e.g. for toxicity testing of drinking water, comprising fluorometer for determining effect on chlorophyll fluorescence in biological samples

Publication number: DE19910436

Publication date: 2000-10-12

Inventor: SCHREIBER ULRICH (DE); GADEMANN ROLF (DE)

Applicant: SCHREIBER ULRICH (DE); GADEMANN ROLF (DE)

Classification:

- international: G01N33/18; G01N33/18; (IPC1-7): G01N33/18;
G01N21/64

- european: G01N33/18F1

Application number: DE19991010436 19990310

Priority number(s): DE19991010436 19990310

Report a data error here

Abstract of DE19910436

In apparatus for detecting photosynthesis herbicides (I) in water, by determination of chlorophyll fluorescence and quantum yield in biological samples, (i) a stronger light flash is used before establishing the fluorescence yield; and/or (ii) 2 identical chambers are used for the fluorescence determination, each containing a suspension of the sample either in the test water or in pure water. Apparatus for detecting contamination of water by photosynthesis herbicides (I), by determination of chlorophyll fluorescence and the photochemical quantum yield of photosystem II in photosynthetically active biological samples (II), uses measuring light pulses to establish the fluorescence yield and saturating light pulses in the second region to give the maximum fluorescence yield (F_m). The novelty is that: (i) before establishing the actual fluorescence yield (F), a stronger flash of light (pre-flash) is applied, so that each photosystem II unit lacks at least one light quantum, and the time between the pre-flash and establishing the actual fluorescence yield is adjusted (to ca. 1 second), such that the fluorescence increase induced by the pre-flash is relaxed in non-inhibited photosystem II units, while it remains in inhibited photosystem II units; and/or (ii) two identical adjusting measuring chambers are used for the fluorescence determination, one containing a suspension of (II) in the water to be tested and the other containing a suspension of (II) in pure water, so that illumination of the two samples to determine the fluorescence yields F and F_m are carried out under identical conditions and the ratio of the quantum yields determined from these measured values gives the percentage inhibition of photosynthesis by (I) in the water to be tested.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 199 10 436 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/18
G 01 N 21/64

21 Aktenzeichen: 199 10 436.0
22 Anmeldetag: 10. 3. 1999
43 Offenlegungstag: 12. 10. 2000

DE 199 10 436 A 1

71 Anmelder:
Schreiber, Ulrich, Dr., 97082 Würzburg, DE;
Gademann, Rolf, 97080 Würzburg, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

56 Entgegenhaltungen:
DE 43 34 327 C2
DE 35 18 527 C2
EP 08 11 842 B1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Zweikanal-Chlorophyllfluorometer für Toxizität - Biotests

57 Die Erfindung betrifft ein Chlorophyllfluorometer mit synchron angesteuerten LEDs und einem Mikroprozessor-kontrollierten Lichtpulsprogramm zur Bestimmung der Quantenausbeute von Photosystem II. Das Lichtpulsprogramm umfaßt einen sättigenden Blitz kurz vor Messung der Fluoreszenzausbeute zwecks Unterscheidung gehemmter und ungehemmter Photosystem II-Einheiten. Das Meßsystem ist mit zwei identischen Meßkammern zur Aufnahme einer Kontrollprobe und einer zu untersuchenden Probe ausgerüstet. Kleine Herbizid-bedingte Unterschiede werden auch dann erfaßt, wenn die Quantenausbeuten der Einzelproben infolge von Vorbelichtung der Alterung absinken. Durch Verwendung starker, aber kurzer Meßlichtpulse, sowie aufgrund effizienter Fluoreszenzsammlung ist das Signal/Rausch-Verhältnis auch bei verdünnten Proben ($< 1 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) hoch. Das Zweikanal-Chlorophyllfluorometer eignet sich zur Konzentrations-Bestimmung von Photosynthese-Herbiziden in Wasserproben, unter Verwendung einzelliger Algen oder isolierter Protoplasten, Chloroplasten und Thylakoide. Von besonderer praktischer Bedeutung sind Messungen mit Suspensionen standardisierter, gefriergetrockneter Thylakoide. Bei diesem Thylakoid-Biotest-System liegt die Erfassungsgrenze für Photosynthese-Herbizide unterhalb des in der Trinkwasserverordnung festgelegten maximalen Gehalts von $0,1 \mu\text{g/l}$ je Wirkstoff.

DE 199 10 436 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Meßeinrichtung nach dem Oberbegriff der nebengeordneten Ansprüche 1 und 2.

Eine derartige Meßeinrichtung ist bereits aus der Patentschrift DE-PS 35 18 527 A1 bekannt. Die auf der Grundlage dieser Patentschrift hergestellten sogenannten PAM-Fluorometer (PAM, als Abkürzung für Puls-Amplituden-Modulation) charakterisieren den bisherigen Stand der Technik in der Detektion von Herbiziden in Wasserproben mit Hilfe von photosynthetisch aktiven Organismen und Chlorophyllfluoreszenzmessungen (R. Conrad, C. Büchel, C. Wilhelm, W. Arsalane, C. Berkaloff und J.-C. Duval. Changes in yield of in-vivo fluorescence of chlorophyll a as a tool for selective herbicide monitoring. *J. of Applied Phycology* 5: 505–516, 1993; J. Bausch-Weis, S. Overmeyer und H. Schnabl. Chloroplast thylakoids as a herbicide indicator in drinking water. *Vom Wasser* 83: 235–241, 1994; S. Trappmann, N. Etxebarria, H. Schnabl und K.-H. Grobecker. Progress in herbicide determination with the thylakoid bioassay. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 5: 17–20, 1998). Bei den PAM-Messungen wird die Fluoreszenz mit μ sec-Meßlichtpulsen periodisch angeregt und das pulsmodiulierte Meßsignal, welches die Fluoreszenzausbeute (F) widerspiegelt, wird selektiert verstärkt. Zur Bestimmung der photochemischen Quantenausbeute von Photosystem II in photosynthetisch aktiven Organismen wird die Lichtintensität kurzfristig (für ca. 1 sec) stark erhöht (Applikation von sättigenden Lichtpulsen), so daß durch eine vorübergehende Sättigung der Energieumwandlung in den Reaktionszentren von Photosystem II die Fluoreszenzausbeute auf einen maximalen Wert (Fm) steigt. Die dabei erfolgende relative Fluoreszenzerhöhung, (Fm-F)/Fm, stellt eine weitgehend anerkannte Maßzahl für die Quantenausbeute der photochemischen Energieumwandlung in Photosystem II-Reaktionszentren dar (B. Genty, J.-M. Briantais und N. Baker. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem. Biophys. Acta* 990: 87–92, 1989). Diese Quantenausbeute wird in dem Maße erniedrigt, wie der primäre Elektronenakzeptor von Photosystem II (Q_A) in den reduzierten Zustand überführt wird. Im Extremfall, wenn bei Lichtsättigung die lichtgetriebene Q_A -Reduktion wesentlich schneller ist als die als Dunkelreaktion ablaufende Q_A -Oxidation durch den sekundären Akzeptor (Q_B) und den sich anschließenden Elektronenspeicher (sogenannter Plastochinon-Pool), ist Q_A vollständig reduziert und die photochemische Quantenausbeute ist null. Alle Herbizide, welche den photosynthetischen Elektronenfluß hemmen, verlangsamen den Abfluß von Elektronen an der Akzeptorseite von Photosystem II und erhöhen dadurch die Fluoreszenzausbeute, F, wobei sie gleichzeitig die Quantenausbeute, (Fm-F)/Fm, erniedrigen. Dies gilt insbesondere für Photosystem II-Herbizide, welche zwischen dem primären Akzeptor Q_A und dem sekundären Akzeptor Q_B binden. Auf diesen physiologischen Grundlagen basieren praktisch alle bisher angewandten Verfahren zur Bestimmung der Herbizid-Konzentration in Wasserproben mit Hilfe photosynthetisch aktiver Systeme, wie einzelligen Algen und isolierten Chloroplasten, Thylakoiden oder Protoplasten, unter Verwendung von Standard-PAM-Fluorometern. Die Grenzen dieser Verfahren, und damit die Erfassungsgrenzen für Photosynthese-Herbizide, werden vor allem durch die folgenden Probleme bedingt:

- a) Damit die Bindung von Photosystem II-Herbiziden zu einer maximalen Senkung der Photosystem II-Quantenausbeute führt, muß sichergestellt werden, daß die gehemmten Zentren bei Messung der Fluoreszenz-

ausbeute (F) reduziert vorliegen. Im Prinzip kann dieses Ziel zwar durch eine hohe Meßlichtintensität oder durch Hintergrundlicht erreicht werden. Dabei ergeben sich jedoch Nebenwirkungen durch die Vorbelichtung, welche sich in der Praxis besonders dann als störend erweisen, wenn zum Erreichen einer ausreichend hohen Meßgenauigkeit zahlreiche Messungen gemittelt werden müssen. Weiterhin darf die Lichtintensität nicht so hoch sein, daß sekundäre Elektronentransportschritte limitierend werden und dadurch auch ein Teil der ungehemmten Reaktionszentren reduziert vorliegt.

- b) Das biologische Untersuchungsmaterial zeigt in der aktuellen Quantenausbeute von Photosystem II eine Variabilität von mehreren Prozent, welche bei einzelligen Algen und Protoplasten unter anderem auf vielfältige Wechselwirkungen des Photosyntheseapparates mit anderen Stoffwechselprozessen zurückzuführen ist und bei isolierten Chloroplasten und Thylakoiden vor allem im Zusammenhang mit Vorbelichtungseffekten, Lichtregulation, Lichtschädigung und Alterungsprozessen steht. Dabei ist zu bedenken, daß nach der Trinkwasserverordnung (Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe vom 5. Dezember 1990. BGBl. Bd. I: 2613–2629, 1991) der Gehalt an Herbiziden im Trinkwasser 0,1 μ g/l pro Wirkstoff nicht überschreiten darf und daß dies z. B. im Falle von Diuron einer Senkung der Quantenausbeute um wenige Prozent entspricht.

- c) Zum Erreichen einer hohen Genauigkeit bei der Bestimmung der Quantenausbeute über den Fluoreszenzparameter (Fm-F)/Fm können zur Detektion sehr kleiner Herbizid-Konzentrationen keine hohen Chlorophyllkonzentrationen eingesetzt werden, da anderenfalls durch die Bindung des Herbizids an eine große Zahl von Photosystem II-Einheiten die Konzentration des freien Herbizids signifikant erniedrigt und dadurch das Meßergebnis verfälscht würde. Die maximal zulässige Chlorophyllkonzentration liegt bei ca. 1 μ g/ml. Bei einer derart niedrigen Chlorophyllkonzentration, welche mit dem bloßen Auge kaum als grün wahrzunehmen ist, ist das Signal/Rausch-Verhältnis der bisher gebräuchlichen PAM-Fluorometer, die für Messungen an Blättern entwickelt wurden, bei weitem nicht ausreichend, um die Berechnung des Quantenausbeute-Parameters (Fm-F)/Fm mit der erforderlichen Genauigkeit von ca. 1% zu ermöglichen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die unter (a)–(c) genannten Probleme zu überwinden und daher eine Meßeinrichtung zu schaffen, mit welcher

- a) bei Messung der Fluoreszenzausbeute, F, die Reduktion des primären Akzeptor Q_A in gehemmten Photosystem II-Reaktionszentren sichergestellt ist, ohne daß gleichzeitig ein signifikanter Teil des primären Akzeptor Q_A in ungehemmten Photosystem II-Reaktionszentren reduziert vorliegt
- b) größere unspezifische Variationen in der Quantenausbeute, welche durch die Vorgeschichte und insbesondere Vorbelichtungen der untersuchten photosynthetisch aktiven Probe bedingt sind, nicht grundsätzlich die Erfassung kleinerer spezifischer Änderungen der Quantenausbeute in Frage stellen, die auf einer partiellen Hemmung von Photosystem II-Reaktionszentren beruhen
- c) die Meßempfindlichkeit so hoch ist, daß auch bei niedrigen Chlorophyllkonzentrationen die ermittelte Quantenausbeute nicht durch die Amplitude des

Rauschsignals bei der Bestimmung der Fluoreszenzausbeuten F und Fm limitiert wird.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Merkmale der Ansprüche 1-3 gelöst.

Die Merkmale der Ansprüche 4-6 geben vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung an.

Dadurch, daß gemäß Anspruch 1 kurz vor der Messung der aktuellen Chlorophyllfluoreszenzausbeute ein kurzer sättigender Lichtblitz gegeben wird, kann sichergestellt werden, daß in allen gehemmten Reaktionszentren der primäre Elektronenakzeptor zum Zeitpunkt der Messung reduziert vorliegt. Da dieser Lichtblitz nur eine Länge von ca. 2 msec besitzt, werden pro Reaktionszentrum und Blitz nur ca. 1-2 Elektronen transportiert, so daß in der sich anschließenden Zeit vor Messung der Fluoreszenzausbeute den ungehemmten Zentren ein fast vollständig oxidiertes sekundärer Elektronenakzeptor-Speicher (Plastochinon-Pool mit einer Kapazität für ca. 15 Elektronen) zur Reoxidation Verfügung steht. Damit unterscheidet sich dieser kurze sättigende Vorblitz grundsätzlich von den wesentlich längeren sättigenden Lichtpulsen, welche zur vollständigen Reduktion des gesamten Photosystem II-Akzeptor-Speichers (inklusive Plastochinon-Pool) und zur Induktion der maximalen Fluoreszenzausbeute Fm eingesetzt werden. Die Applikation des sättigenden Vorblitzes ermöglicht nicht nur eine optimale Unterscheidung zwischen gehemmten und ungehemmten Reaktionszentren, sondern gewährleistet auch eine äußerst schonende Belichtung der photosynthetisch aktiven Probe, so daß zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses mehrere Messungen an derselben Probe gemittelt werden können.

Indem gemäß Anspruch 2 zwei identische Meßkammern eingesetzt werden, wobei sich in der ersten die zu untersuchende Probe und in der zweiten eine mit reinem Wasser angesetzte Referenzprobe befindet, und indem diese beiden Proben vor Außenlicht geschützt die gleiche Behandlung erfahren, so daß ihre Vorgeschichten bei jeder Messung identisch sind, wird erreicht, daß auch die Zeit- und Vorbelichtungsbedingten physiologischen Änderungen der Quantenausbeute im Verlaufe einer Meßserie bei beiden Proben praktisch identisch sind. Dies gilt vor allem bei niedrigen Herbizidkonzentrationen, wenn die Quantenausbeute primär durch die Eigenschaften der ungehemmten photosynthetischen Einheiten bestimmt wird. Bei Verwendung identischer Proben in den beiden Meßkammern bleibt das Verhältnis der beiden Quantenausbeuten (Y1 gemessen in der Meßkammer 1, und Y2' gemessen in der Meßkammer 2) konstant bei 1, während gleichzeitig im Verlaufe einer längeren Meßserie mit zahlreichen aufeinander folgenden Belichtungszyklen die Quantenausbeuten Y1 und Y2 der Einzelproben um mehrere Prozent absinken können. Dagegen betrifft eine Absenkung der Quantenausbeute durch Herbizid-Einwirkung spezifisch nur eine der beiden Proben (in der Meßkammer 1), was sich in einer entsprechenden Erniedrigung des Verhältnisses Y1/Y2 ausdrückt, wobei der Ausdruck $100 - 100 \cdot Y1/Y2$ die prozentuale Hemmung der Probe beschreibt. In der Praxis entspricht bei standardisierten Meßproben eine bestimmte prozentuale Hemmung einer definierten Konzentration des bekannten Photosystem II-Herbizids Diuron. So kann nach Kalibrierung die Toxizität der zu untersuchenden Wasserprobe in Diuron-Äquivalenten angegeben werden.

Indem gemäß Anspruch 3 in beiden Meßkammern Gruppen von synchron angesteuerten LEDs verwendet werden, die auf die gleichen Punkte in den Meßproben ausgerichtet sind, können durch Wahl einer ausreichenden Anzahl von LEDs die Lichtintensitäten an den Kreuzungspunkten so

hoch eingerichtet werden, daß im Vorblitz innerhalb von ca. 2 msec der primäre Photosystem II-Akzeptor vollständig reduziert wird und im sättigenden Lichtpuls von ca. 1 sec zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenzausbeute (Fm) der gesamte Photosystem II-Akzeptor-Speicher durchreduziert wird. Weiterhin steht dieselbe hohe Intensität der LEDs auch für die eigentlichen Messungen der Fluoreszenzausbeuten F und Fm zur Verfügung, so daß ein entsprechend starkes Fluoreszenzsignal erzielt wird und das Signal/Rausch-Verhältnis auch bei geringer Chlorophyllkonzentration hoch ist. Da diese Messungen mit Hilfe von Meßlichtpulsen durchgeführt werden, kann trotz einer hohen Pulsamplitude die Lichtbelastung der photosynthetisch aktiven Probe dadurch niedrig gehalten werden, daß die Pulslänge kurz, der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen groß und die Anzahl der Pulse gering gewählt werden.

Indem gemäß Anspruch 4 die Ansteuerung der LED-Pulse mit Hilfe eines vorprogrammierten Mikroprozessors erfolgt, wird sichergestellt, daß das komplexe Belichtungsprogramm mit hoher digitaler Genauigkeit in beiden Meßkammern identisch abläuft.

Durch die Verwendung von Kugellinsen, welche gemäß Anspruch 5 in geringem Abstand von den Fluoreszenzmeßstellen angeordnet sind, wird ein großer Raumwinkel der in alle Richtungen abgestrahlten Fluoreszenz gesammelt und auf den Photodetektor fokussiert. Auf diese Weise wird nicht nur die Signalamplitude erhöht, sondern auch das Verhältnis vom Nutzsignal (Chlorophyllfluoreszenz) zum Hintergrundsignal (gestreutes Anregungslicht und Glasfluoreszenz) erhöht.

Die Verwendung einer PIN-Photodiode als Photodetektor gemäß Anspruch 6 ist vorteilhaft, da sich diese bei einer relativ großen lichtempfindlichen Fläche durch kurze Ansprechzeiten auszeichnet und deshalb zur Erfassung der μ sec-Meßlichtpulse angeregten Fluoreszenzpulse besonders gut geeignet ist.

Bevorzugte Anwendungsfelder der vorliegenden Erfindung sind die Gewässer- und Trinkwasser-Überwachung, sowie die Pflanzenschutzforschung: Als photosynthetisch aktive Systeme, welche aufgrund ihres Chlorophyllfluoreszenzverhaltens zur Detektion von Photosynthese-Herbiziden eingesetzt werden können, eignen sich sowohl intakte Algenzellen, als auch isolierte Protoplasten, Chloroplasten und Thylakoide höherer Pflanzen. Von besonderer praktischer Bedeutung ist dabei der Thylakoid-Biotest (Bausch-Weis et al. 1994; Trapmann et al. 1998), bei welchem gefriergetrocknete Thylakoide eingesetzt werden, mit den Vorteilen maximaler Empfindlichkeit, guter Reproduzierbarkeit und leichter Handhabung. Aufgrund der sehr geringen Chlorophyllmengen, welche für die Fluoreszenzmessungen mit der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung benötigt werden, ist der Verbrauch der gefriergetrockneten Thylakoide äußerst gering (ca. 1 mg pro Meßansatz mit zwei Parallelproben), wodurch die Verbrauchskosten dieses Biotests sehr niedrig sind. Dadurch, daß mit der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung immer die Aktivitäten von zwei Parallelproben verglichen werden, die aus dem gleichen Meßansatz (z. B. Thylakoid-Suspension) stammen, spielen die absolute Chlorophyllkonzentration und die absolute Photosynthese-Aktivität nur eine untergeordnete Rolle. So wird praktisch das gleiche Ergebnis (ausgedrückt in % Inhibition) erhalten, wenn die Chlorophyllkonzentration z. B. halbiert wird oder die photochemische Quantenausbeute der Einzelproben z. B. durch Alterung auf 50% absinkt. Dieser Aspekt ist von beträchtlicher praktischer Bedeutung, da zum Erreichen einer hohen Reproduzierbarkeit des biologischen Materials ein hoher Aufwand erforderlich wäre. Schließlich kann hervor-
gehoben werden, daß die Messungen mit der erfindungsge-

mäßen Einrichtung sehr schnell und mit geringem experimentellem Aufwand erfolgen können. Durch einen Tastendruck werden die vorprogrammierten Belichtungs- und Meßperioden in den beiden Meßkammern ausgelöst und innerhalb von weniger als 10 sec wird das Meßergebnis (% Inhibition) angezeigt. Messungen mit einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Einrichtung (dem sogenannten "Tox-Y-Test Dual Channel Yield Analyzer") unter Verwendung von gefriergetrockneten, resuspendierten Thylakoiden ergaben eine Erfassungsgrenze von 0.1 µg Diuron/l bei Einzelmessungen, welche durch Mittelung mehrerer Messungen erniedrigt werden konnte.

Nachfolgend wird anhand der Zeichnungen eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Zweikanal-Chlorophyllfluorometers für Toxizität-Biotests beschrieben.

In den Zeichnungen zeigt

Abb. 1 ein schematisches Zeitdiagramm der verschiedenen Pulsbelichtungen im Verlaufe einer Messung und der parallel dazu verlaufenden Änderungen der Chlorophyllfluoreszenzausbeute,

Abb. 2 ein Schema der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II und des Elektronentransports an der Akzeptorseite,

Abb. 3 eine Skizze der Anordnung der opto-elektronischen Bauelemente innerhalb einer Meßkammer,

Abb. 4 eine Graphik der Beziehung zwischen prozentualer Inhibition und Diuron-Konzentration in µg Diuron/Liter.

Abb. 1 zeigt in einem schematischen Zeitdiagramm die Abfolge der verschiedenen Pulsbelichtungen im Verlaufe einer einzelnen Messung, welche in den beiden Meßkammern jeweils mit Hilfe derselben, synchronisierten LEDs durchgeführt werden. Parallel dazu sind schematisch die typischerweise durch diese Belichtungen hervorgerufenen Änderungen der Chlorophyllfluoreszenzausbeute wiedergegeben. In der dargestellten Ausführungsform sind die Intensitäten der verschiedenen Pulsbelichtungen gleich. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen auf die Fluoreszenzausbeute des photosynthetisch aktiven Untersuchungsmaterials ergeben sich aus den Pulslängen und den Zeiten zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulsen. Der Vorblitz 1 hat eine Pulslänge von 2 msec, welche bei der gegebenen hohen Quantenstromdichte (ca. 3000 µmol Quanten/m² s) der vorliegenden Ausführungsform ausreicht, um in jedem Photosystem II-Reaktionszentrum den primären Akzeptor Q_A zu reduzieren. Die Meßlichtpulse 2 und 4 sind dagegen nur 5 µsec lang, so daß die durch einen einzelnen Puls bewirkte Q_A-Reduktion vernachlässigbar klein ist. Der sättigende Lichtpuls 3 wiederum ist 1 sec lang und reduziert nicht nur den primären Akzeptor Q_A sondern auch den gesamten sekundären Akzeptorspeicher. Diese vollständige Reduktion aller Akzeptoren ist erforderlich für die Herbeiführung der maximalen Fluoreszenzausbeute F_m. Von zentraler Bedeutung für die Funktionsweise der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung ist der Vorblitz 1, welcher einen maximalen Unterschied in den Fluoreszenzausbeuten von Kontrollprobe und Diuron-belasteter Probe bewirkt. Diuron und andere Photosystem II-Herbizide binden zwischen dem primären Elektronenakzeptor Q_A und dem sekundären Elektronenakzeptor Q_B. So ist in Gegenwart einer sättigenden Diuron-Menge die Reoxidation des im Licht reduzierten Q_A im Vergleich mit einer Kontrolle sehr langsam, was sich in einem stark verlangsamten Fluoreszenzabfall nach der durch den Vorblitz 1 bewirkten Fluoreszenzerhöhung äußert. In einer Kontrollprobe ist dieser Fluoreszenzabfall erfahrungsgemäß polyphasisch und weitgehend innerhalb von ca. 100 msec bis 1 sec abgeschlossen. Wenn nun die Meßlichtpulse 2 zur Erfassung der Fluoreszenzausbeute F ca. 100 msec nach dem Vorblitz gegeben werden, entspricht die Fluoreszenzausbeute der Kon-

trolle (F_{Kontrolle} = F₂) in etwa der Fluoreszenzausbeute vor dem Vorblitz 1, wohingegen die Fluoreszenzausbeute der Diuronprobe (F_{Diuron} = F₁) in erster Näherung gleich der maximalen Fluoreszenzausbeute F_m ist. So ergibt sich für die Kontrolle aus der Beziehung $Y_2 = (F_m - F_2)/F_m$ ein hoher Wert der photochemischen Quantenausbeute, während bei der Diuron-gesättigten Probe gilt: $Y_1 = (F_m - F_1)/F_m = 0$. In diesem extremen Fall ist die prozentuale Hemmung 100%, entsprechend der Beziehung: Prozentuale Hemmung = $100 - 100 Y_1/Y_2$. In der Praxis liegen wesentlich geringere Inhibitorkonzentrationen vor, so daß die prozentuale Hemmung in der Größenordnung von wenigen Prozent ist.

Abb. 2 zeigt ein Schema der photochemischen Energieumwandlung im Photosystem II und des Elektronentransports auf der Akzeptorseite von Photosystem II. Dieses Schema kann dazu dienen, die Grundlagen der vorliegenden Erfindung und insbesondere den kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 zu erläutern. In photosynthetischen Organismen ist das Chlorophyll in Antenneneinheiten organisiert, an deren Ende die sogenannten Reaktionszentren angeordnet sind, an welchen die photochemische Energieumwandlung stattfindet. Im Photosystem II sensibilisiert das spezielle Chlorophyll P680 den Elektronenübergang von einem Donor D zu dem primären Elektronenakzeptor Q_A, die sogenannte Ladungstrennung. Wenn in allen Reaktionszentren Q_A oxidiert ist, ist die Chlorophyllfluoreszenzausbeute minimal, wohingegen die Chlorophyllfluoreszenzausbeute maximal ist, wenn in allen Reaktionszentren Q_A reduziert ist. Nach einem sättigenden Lichtblitz, der wie der Vorblitz 1 in der erfindungsgemäßen Meßeinrichtung in allen Reaktionszentren eine Ladungstrennung durchführt, wird normalerweise Q_A innerhalb von 10–100 msec durch den sekundären Akzeptor Q_B wieder reoxidiert, von welchem die Elektronen in den Sekundären Akzeptor-Speicher fließen, so daß nach 100 msec mit Hilfe der Meßlichtpulse 2 eine niedrige Fluoreszenzausbeute gemessen wird. Photosystem II-Herbizide wie Diuron verhindern die Reoxidation von Q_A durch Q_B, so daß im Gegensatz zur ungehemmten Kontrolle auch 100 msec bis 1 sec nach dem Vorblitz 1 die Fluoreszenzausbeute maximal ist. Bei der Kontrolle kann dann mit Hilfe der Meßlichtpulse 4 eine maximale Fluoreszenzausbeute gemessen werden, wenn mit Hilfe des sättigenden Lichtpuls 3 bei einer Pulslänge im sec-Bereich der gesamte Elektronenspeicher auf der Akzeptorseite von Photosystem II durchreduziert wird. Die Kenntnis der maximalen Fluoreszenzausbeute F_m ist wichtig, um mit Hilfe der Beziehung $Y = (F_m - F)/F_m$ die photochemische Quantenausbeute zu berechnen. Da es sich bei diesem Ausdruck um das Verhältnis von Fluoreszenzausbeuten handelt, welche kurz nacheinander an derselben Probe gemessen werden, ist Y weitgehend unabhängig von der Chlorophyllkonzentration, der absoluten Meßpulsamplitude und geometrisch-optischen Faktoren, welche die absolute Signalamplitude beeinflussen.

Abb. 3 zeigt eine Skizze der Anordnung der opto-elektronischen Komponenten in einer Meßkammer einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Zweikanal-Chlorophyllfluorometers. Eine Gruppe von LEDs 5 ist kranzförmig um einen zylindrischen Probenraum 7 mit Glaswänden (Küvette) angeordnet, so daß sich die LED Lichtstrahlen in einem Punkt 6 kurz über dem Küvettenboden kreuzen. Dicht unter dem Küvettenboden befindet sich eine Kugellinse 8, welche einen relativ großen Raumwinkel der in der Probe angeregten Chlorophyllfluoreszenz sammelt und auf den Photodetektor 9 bündelt. Die Kugellinse ist relativ zum Kreuzungspunkt 6 der LED-Strahlen und zum Photodetektor 9 so angeordnet, daß sie den Kreuzungspunkt 6 auf dem Photodetektor abbildet. Diese Anordnung fördert das Verhältnis von Nutzsignal (Chlorophyllfluoreszenz) zu

Hintergrundsignal (gestreutes Meßlicht und Glasfluoreszenz). Weiterhin ist zwischen der Kugellinse 8 und dem Photodetektor 9 ein Farbfilter 10 angeordnet, welches gestreutes Meßlicht absorbiert und die Chlorophyllfluoreszenz transmittiert.

In Abb. 4 ist die Beziehung zwischen der prozentualen Inhibition und der Diuron-Konzentration in μg Diuron/Liter graphisch dargestellt, wie sie mit einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Zweikanal-Chlorophyllfluorometers (Tox-Y-Test Dual Channel Yield Analyzer) bestimmt wurde. Bei Meßwert-Mittelung ($n = 10-20$) ermöglicht diese Einrichtung die Erfassung der % Inhibition mit einer Standardabweichung um 0,1% und eignet sich somit zur Erfassung von Diuron-Konzentrationen unterhalb des von der Trinkwasserverordnung angegebenen Grenzwerts von 0,1 μg Diuron/Liter.

Patentansprüche

1. Einrichtung zur Bestimmung der Wasserverunreinigung durch Photosynthese-Herbizide mit Hilfe von Messungen der Chlorophyllfluoreszenz und der photochemischen Quantenausbeute von Photosystem II in photosynthetisch aktiven biologischen Proben unter Verwendung von

- a) Meßlichtpulsen im μsec -Bereich zur Erfassung der Fluoreszenzausbeute und
- b) sättigenden Lichtpulsen im sec -Bereich zur Herbeiführung der maximalen Fluoreszenzausbeute (F_m)

dadurch gekennzeichnet, daß

vor der Erfassung der aktuellen Fluoreszenzausbeute (F) ein kurzer, starker Lichtblitz (Vorblitz) im msec -Zeitbereich (1) appliziert wird, so daß auf jede Photosystem II-Einheit mindestens ein Lichtquant fällt, wobei die Zeit zwischen dem Vorblitz (1) und der Erfassung der aktuellen Fluoreszenzausbeute (2) so bemessen ist (ca. 1 sec), daß die durch den Vorblitz induzierte Fluoreszenzerhöhung in ungehemmten Photosystem II-Einheiten relaxiert ist, während sie in gehemmten Photosystem II-Einheiten noch besteht.

2. Einrichtung zur Bestimmung der Wasserverunreinigung durch Photosynthese-Herbizide mit Hilfe von Messungen der Chlorophyllfluoreszenz und der photochemischen Quantenausbeute von Photosystem II in photosynthetisch aktiven biologischen Proben unter Verwendung von

- a) Meßlichtpulsen im μsec -Bereich zur Erfassung der Fluoreszenzausbeute und
- b) Sättigenden Lichtpulsen im sec -Bereich zur Herbeiführung der maximalen Fluoreszenzausbeute (F_m),

dadurch gekennzeichnet, daß

für die Fluoreszenzmessungen zwei identische Meßkammern eingerichtet sind, wobei die eine Kammer die biologische Probe im zu untersuchenden Wasser und die andere Kammer die biologische Probe in reinem Wasser suspendiert enthält, so daß die Belichtungen der beiden Proben zur Bestimmung der Fluoreszenzausbeuten F und F_m unter identischen Bedingungen erfolgen und aus dem Verhältnis der aus diesen Meßwerten berechneten photochemischen Quantenausbeuten die prozentuale Hemmung der Photosynthese durch die in dem zu untersuchenden Wasser enthaltenen Herbizide berechnet werden kann.

3. Einrichtungen nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Mittel zur Erzeugung der Meßlichtpulse (2 und 4), der sättigenden Lichtpulse

(3) und des Vorblitzes (1) in den beiden Meßkammern Gruppen von synchron angesteuerten LEDs (5) verwendet werden, welche jeweils auf den gleichen Punkt (6) in den beiden Probenräumen (7) ausgerichtet sind. 4. Einrichtungen nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Ansteuerung der LED-Pulse sowie die Erfassung der Fluoreszenzausbeuten F und F_m mit Hilfe eines vorprogrammierten Mikroprozessors erfolgt, durch welchen die Pulsintensitäten, die Pulslängen, die Zeiten zwischen aufeinander folgenden Pulsen, die Anzahl der Pulse und die Erfassungszeiten der Fluoreszenzausbeuten F und F_m bestimmt werden, wobei dieselben LEDs dazu dienen, den Vorblitz (1), die Meßlichtpulse (2 und 4) und die sättigenden Lichtpulse (3) zur Herbeiführung der maximalen Fluoreszenzausbeute F_m zu liefern.

5. Einrichtungen nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß in geringem Abstand von den Kreuzungspunkten der LED-Strahlen (6) in den beiden Probenräumen (7) jeweils eine Kugellinse (8) angeordnet ist, welche die durch das Meßlicht angeregte Chlorophyllfluoreszenz auf den Photodetektor (9) fokussiert, der durch ein optisches Filter (10) geschützt ist, welches gestreutes Meßlicht absorbiert und die Chlorophyllfluoreszenz transmittiert.

6. Einrichtungen nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Photodetektor (9) in beiden Probenräumen jeweils eine PIN-Photodiode verwendet wird.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

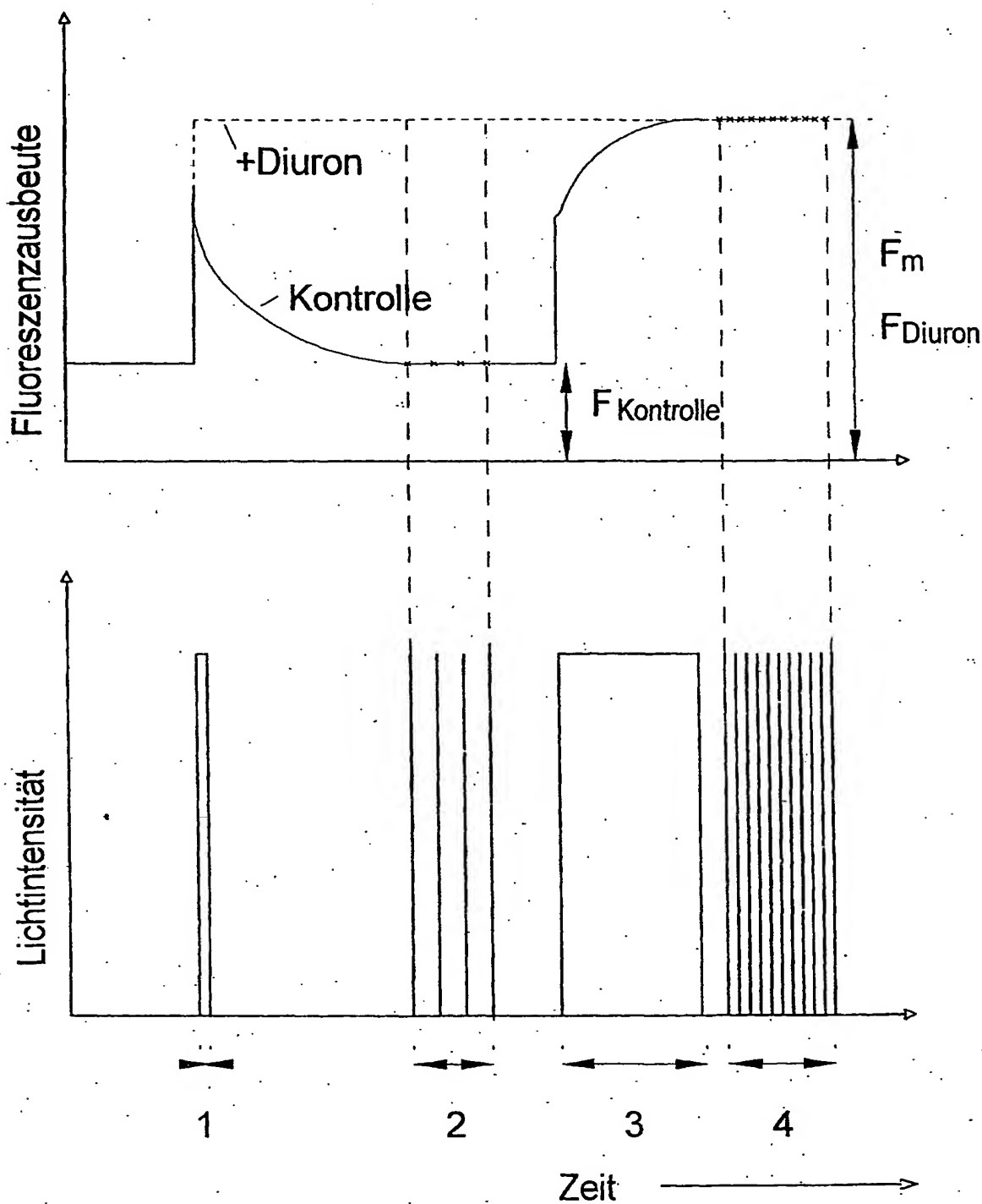


Abbildung 1

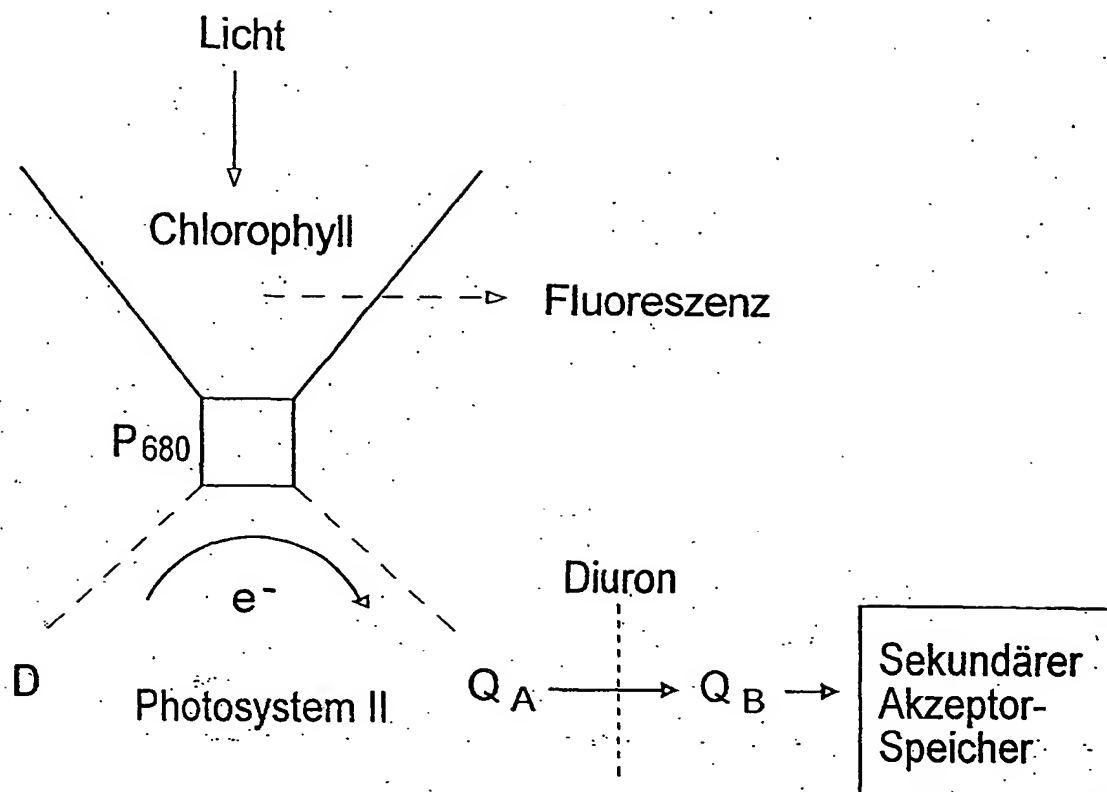


Abbildung 2

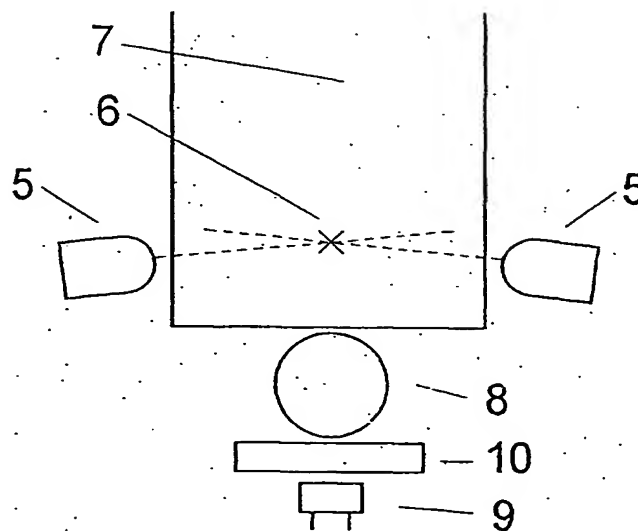


Abbildung 3

Abbildung 4

